

Serologische
Untersuchungen über Vibrionen

Werner Scharf

Aus dem Tierhygienischen Institut der Universität München
Vorstand: Professor Dr. A. M e y n

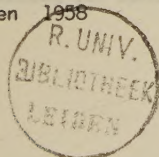
S e r o l o g i s c h e

Untersuchungen über Vibrionen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Werner S c h a r f
Veterinärpraktikant
aus
L e u b n i t z

München 1958



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Z i p f

Referent: Professor Dr. A. M e y n

Tag der Promotion: 26. Februar 1958

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Vorwort	1
2. Literatur	2
3. Zusammenfassung	3
4. Zusammenfassung	4
5. Zusammenfassung	5
6. Zusammenfassung	6
7. Zusammenfassung	7
8. Zusammenfassung	8
9. Zusammenfassung	9
10. Zusammenfassung	10
11. Zusammenfassung	11
12. Zusammenfassung	12
13. Zusammenfassung	13
14. Zusammenfassung	14
15. Zusammenfassung	15
16. Zusammenfassung	16
17. Zusammenfassung	17
18. Zusammenfassung	18
19. Zusammenfassung	19
20. Zusammenfassung	20
21. Zusammenfassung	21
22. Zusammenfassung	22
23. Zusammenfassung	23
24. Zusammenfassung	24
25. Zusammenfassung	25
26. Zusammenfassung	26
27. Zusammenfassung	27
28. Zusammenfassung	28
29. Zusammenfassung	29
30. Zusammenfassung	30
31. Zusammenfassung	31
32. Zusammenfassung	32
33. Zusammenfassung	33
34. Zusammenfassung	34
35. Zusammenfassung	35
36. Zusammenfassung	36
37. Zusammenfassung	37
38. Zusammenfassung	38
39. Zusammenfassung	39
40. Zusammenfassung	40
41. Zusammenfassung	41
42. Zusammenfassung	42
43. Zusammenfassung	43
44. Zusammenfassung	44
45. Zusammenfassung	45
46. Zusammenfassung	46
47. Zusammenfassung	47
48. Zusammenfassung	48
49. Zusammenfassung	49
50. Zusammenfassung	50
51. Zusammenfassung	51
52. Zusammenfassung	52
53. Zusammenfassung	53
54. Zusammenfassung	54
55. Zusammenfassung	55
56. Zusammenfassung	56
57. Zusammenfassung	57
58. Zusammenfassung	58
59. Zusammenfassung	59
60. Zusammenfassung	60
61. Zusammenfassung	61
62. Zusammenfassung	62
63. Zusammenfassung	63
64. Zusammenfassung	64
65. Zusammenfassung	65
66. Zusammenfassung	66
67. Zusammenfassung	67
68. Zusammenfassung	68
69. Zusammenfassung	69
70. Zusammenfassung	70
71. Zusammenfassung	71
72. Zusammenfassung	72
73. Zusammenfassung	73
74. Zusammenfassung	74
75. Zusammenfassung	75
76. Zusammenfassung	76
77. Zusammenfassung	77
78. Zusammenfassung	78
79. Zusammenfassung	79
80. Zusammenfassung	80
81. Zusammenfassung	81
82. Zusammenfassung	82
83. Zusammenfassung	83
84. Zusammenfassung	84
85. Zusammenfassung	85
86. Zusammenfassung	86
87. Zusammenfassung	87
88. Zusammenfassung	88
89. Zusammenfassung	89
90. Zusammenfassung	90
91. Zusammenfassung	91
92. Zusammenfassung	92
93. Zusammenfassung	93
94. Zusammenfassung	94
95. Zusammenfassung	95
96. Zusammenfassung	96
97. Zusammenfassung	97
98. Zusammenfassung	98
99. Zusammenfassung	99
100. Zusammenfassung	100

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Literatur	2
1.) Vorkommen und Bedeutung der Vibrionen bei Tieren	2
2.) Serologische Differenzierung der Vibrionen und ihre antigene Struktur	3
3.) Die diagnostische Bedeutung der Agglutinationsreaktion für die Vibriose der Rinder und Schafe	8
4.) Biochemische Differenzierungen und Pathogenität der in den Geschlechtsorganen der Rinder vorkommenden Vibrionen	11
C. Eigene Untersuchungen	13
I. Material und Methodik	13
II. Versuche und Versuchsergebnisse	19
1.) Serumschnellagglutination	19
2.) Serumlangsamagglutination	22
a) Variation der Ablesung	22
b) Variation der Elektrolytkonzentration	26
3.) Serumabsättigungsversuche	32
4.) Agglutinationsreaktionen mit hitzebehandelten Antigenen	37
5.) Prüfung einiger Vibrio-foetus-Stämme mit Normal- rinderserum	37
6.) Biochemische Differenzierung der Vibrionenstämme	40
a) Katalaseprobe	40
b) Schwefelwasserstoffbildung	40
D. Besprechung der Ergebnisse	45
E. Zusammenfassung	48
F. Literaturverzeichnis	49
Lebenslauf	57

A. Einleitung

Vibrionen sind weit verbreitet; sie werden in Wasserpfützen, in Jauche und Kot gefunden. Eine besondere Bedeutung haben die in Geschlechtsorganen von Rindern vorkommenden Vibrionen, vor allem die pathogene Art *Vibrio foetus*, da diese als eine Ursache des Verwerfens und von Fruchtbarkeitsstörungen bei diesen Tieren anzusehen ist. Es ist von besonderer Wichtigkeit, diese Vibrionenart von anderen saprophytären Vibrionen zu trennen.

Neben der biochemischen Unterscheidung der pathogenen von apathogenen Vibrionen, welche in letzter Zeit in den Vordergrund gestellt wurde, ist auch die Frage nach der serologischen Trennung der Arten wichtig.

Meine Aufgabe war es nun, Vibrionenkulturen verschiedener Herkunft serologisch zu untersuchen und ihre antigenen Eigenschaften näher zu bestimmen. Dabei sollten verschiedene Methoden der Serumlangsamagglutination einander gegenübergestellt werden. Anschließend wurde die biochemische Differenzierung der Vibrionenstämme vorgenommen und diese mit den Ergebnissen der serologischen Unterscheidung verglichen.

B. Literatur

1.) Vorkommen und Bedeutung der Vibrionen bei Tieren

Die weitaus größte Bedeutung der bei unseren Nutztieren vorkommenden Vibrionen wird der Art zugemessen, welche in den Genitalorganen der Rinder und Schafe angetroffen werden kann. Demgemäß ist auch das Schrifttum darüber umfangreich. Weniger Arbeiten liegen vor über eine im Darmtrakt bei Tieren vorkommende Art der Gattung *Vibrio*: *Vibrio jejuni*.

Mc. Fadyean und Stockmann (15) hatten 1909 in England, sowie Smith und Taylor (59) in Amerika bei Abort von Rindern und Schafen erstmalig Spirillen nachgewiesen. Th. Smith (59) nannte den Erreger *Vibrio foetus*. Seither gilt er als der ätiologische Faktor des seuchenhaften Verwerfens. Auch Lerche (34) fand 1922 Spirillen als Ursache des ansteckenden Verkalbens.

Jones, Orcutt und Little (29) beschrieben 1931 den *Vibrio jejuni*. Dieser Keim löste bei Kälbern und Rindern eine Krankheit aus, welche in epidemischer Form vorkommt und als "black diarrhoea" bezeichnet wird.

Vibrionen sind 4 - 5 μ große, kommaförmige und begeißelte Zellen mit starker Beweglichkeit, oft kommen auch Gebilde mit mehreren Windungen vor.

Schon vor 1900 waren - außer dem bei Menschen vorkommenden *Vibrio cholerae* - Vibrionen bekannt (Kutscher (32)). Migula (42) beschrieb eine Anzahl davon, die er aus Düngerjauche isolieren konnte. Doyle (12), Schmid und Klingler (57), v. Ballmoos (1), Messerli (40) sowie Dappes und Debrot (9) wiesen Vibrionen nach, die aus dem Darmkanal von Schweinen stammten und dort eine infektiöse Darmerkrankung hervorgerufen hatten. Diese Vibrionenart bezeichneten sie als *Vibrio coli*. Harms und Hörter (24) nannten die aus dem Schweinedarm gezüchteten Keime *Vibrio suis*. Zintz (73) konnte aus dem Kot von Rind und Schwein ebenfalls Vibrionen isolieren.

1953 fand Florent (17) Vibrionen im Praeputium und im Sperma von Bullen. Dieselbe Vibrionenart konnte er in der Scheide einer von diesen Bullen gedeckten Färse nachweisen. Dieser *Vibrio*-Stamm hatte weder Abort noch Unfruchtbarkeit hervorgerufen. Florent bezeichnete diesen Keim als *Vibrio bubulus*. Eine weitere saprophytäre Art wurde genannt und als *Vibrio percolans* bezeichnet.

Das wirtschaftliche Problem einer *Vibrio-foetus*-Infektion liegt nicht in den

Abortusfällen, sondern in der Unfruchtbarkeit (Sjollema (58)). Die *Vibriosis genitalis* verursacht augenblicklich in vielen Ländern den ökonomisch wichtigsten Fruchtbarkeitsschaden bei Rindern (Vandeplasse (65)).

Die Pathogenität von *Vibrio foetus* wird dadurch bewiesen, daß nahezu alle infizierten Bullen verminderte Fruchtbarkeit zeigen. Bei infizierten weiblichen Tieren kann frühzeitig - 1 bis 1 1/2 Monate nach dem Deckakt - Abortus eintreten. Es entwickelt sich eine gewisse Immunität, die im allgemeinen nach 3 - 4 Monaten wieder normale Trächtigkeit gestattet (Vandeplasse (65)). Es kann später eine Reinfektion eintreten. Nur *Vibrio foetus* scheint eine vermehrte Antikörperbildung im Vaginalsekret anzuregen.

Von Easterbrooks und Plastring (13) stammen Arbeiten, in denen die neueren Gesichtspunkte der *Vibriosis* behandelt werden. Die Übertragung findet durch den Deckakt oder die künstliche Besamung statt. In infizierten Herden breitet sich das Leiden auch von Vulva zu Vulva schnell aus. Eine Übertragung der *Vibriose* vom Rind auf das Schaf ist nach Garm, Lindquist und Skjerven (22) nicht wahrscheinlich.

Tierversuche über *Vibrio foetus* bei Schafen machte Lindenstruth (36). Er konnte aus allen abortierten Foeten *Vibrionen* isolieren.

Vibrio foetus scheint in den meisten europäischen Ländern und in den U.S.A. verbreitet zu sein. In Amerika wurden *Vibrio-foetus*-Funde angegeben von Bell (3), Moore (44), Prier (51). Aus europäischen Ländern liegen Berichte aus Holland von Stengenga (61) und Terpstra (62) vor, aus Belgien von Pröger (52), aus Schweden von Lagerlöf (33), in Norwegen konnte Flatla (16) und in Italien Galassi (19) *Vibrio foetus* isolieren.

In Deutschland scheint die Verbreitung von *Vibrio foetus* unterschiedlich zu sein. Von Funden berichteten u.a. Beer (2), Ehrlich (14) sowie Dedié und Voigt (10/11).

2.) Serologische Differenzierung der *Vibrionen* und ihre antigene Struktur

Die gefundenen *Vibrionen*arten waren morphologisch und kulturell meist einheitlich. Deshalb wurden zur Identifizierung von *Vibrio foetus* die serologischen Beziehungen dieses Erregers zu anderen *Vibrionen*arten untersucht.

Smith und Taylor (59) gaben an, daß 21 von ihnen untersuchte *Vibrio*-Stämme, die sie aus abortierten Rinderfoeten gewonnen hatten, untereinander serolo-

gisch ähnlich waren.

Plastringe, Easterbrooks, Walker und Beccia (47) fanden, daß *Vibrio foetus* bovinen Ursprungs zu einer einheitlichen serologischen Gruppe gehört, aber verschieden ist von den Stämmen, die den Abort der Schafe hervorrufen.

Blakemore und Gledhill (6) untersuchten Vibrionenstämme, die Verwerfen bei Schafen verursacht hatten und kamen zu dem Ergebnis, daß die Geißelapparate der Vibrionen die Antigenkomponente sei, welche für die Kreuzagglutinationen zwischen den Stämmen verantwortlich ist; weiter wurde gefolgert, daß ein somatisches Antigen den typenspezifischen Antigenanteil darstellt.

Marsh und Firehammer (38) prüften 23 Schafstämme und 3 Rinderstämme serologisch. Die 23 Schafstämme ließen sich in 4 Typen aufgliedern, während die 3 Rinderstämme von einem Typ zu sein schienen, der zu zwei Schaftypen Reaktionen aufwies.

Price, Poelma und Faber (50) testeten 22 Vibrionen-Stämme, welche aus Rinderfoeten stammten, fünf aus Vaginalschleim von Rindern, ein Stamm aus einem Rinderuterus, drei Stämme aus Bullensamen und ein Stamm von einem an Vibrionendysenterie erkrankten Schwein. Die Versuche zeigten, daß nicht zwischen allen *Vibrio-foetus*-Stämmen, die gegen Kaninchenantiseren getestet wurden, Kreuzagglutinationen möglich waren. Drei nicht von Rinderfoeten gewonnene Kulturen, die aber als *Vibrio foetus* bezeichnet wurden, hatten keine serologischen Beziehungen zu Stämmen, die aus Foeten isoliert worden waren. Der vom Schwein isolierte Stamm zeigte keine Kreuzagglutination mit den verwendeten Seren.

Aus diesen Ergebnissen heraus stellten nun Price, Poelma und Faber (50) folgende Forderungen auf:

1. Durch Erforschung der somatischen Antigenbeziehung sollte geklärt werden, ob die Variation der Kreuzagglutinationen auf Unterschiede der somatischen Antigene beruhen.
2. Es sollte ein Vibrionenstamm gefunden werden, der als Antigen mit einer großen Zahl Rinder- und Kaninchenantiseren möglichst hohe Agglutinationstiterwerte erbringt und so die Forderung nach einem diagnostischen Antigen erfüllt.
3. Serologisch nicht erfaßbare Stämme sollten biochemisch untersucht werden. Die Möglichkeit, daß solche Stämme saprophytär sind und fehlerhafterweise auf Grund morphologischer Kennzeichen als *Vibrio foetus* bezeichnet wurden, gaben den Anreiz zur Forschung.

Als Material zu den nachfolgenden Versuchen verwendeten sie 16 Stämme. 14 hatten sie aus Rinderfoeten isoliert, einen Stamm aus einem Schaf-Foetus und einen aus Rindervaginalschleim. Stämme, welche als Antigen in somatischen Agglutinationstests verwendet wurden, hatten sie 2 Stunden gekocht, um das flagellare Antigen zu zerstören. Außerdem wurde durch Absättigung von Kaninchenantisera mit verschiedenen Antigenen die antigene Struktur der Stämme untersucht. Sie konnten dabei fünf Stammtypen feststellen:

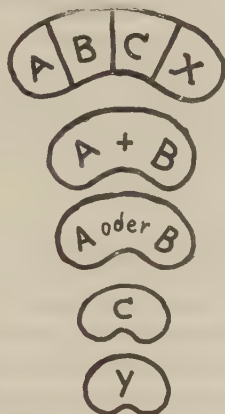
Typ I: Agglutinine vollständig nur von Typ I absorbiert

Typ II: Agglutinine vollständig nur von Typ I und Typ II absorbiert

Typ III: Agglutinine vollständig nur von Typ I, Typ II und III absorbiert

Typ IV: Agglutinine vollständig nur von Typ I und Typ IV absorbiert

Typ V: Agglutinine vollständig nur von Typ I absorbiert



Sie bezeichneten die Antigene vom Typ I willkürlich mit A, B, C, X - dann müßten die Typ II-Stämme Teile, aber nicht alle Fraktionen vom Typ I enthalten. Angenommen, sie enthielten A und B, dann muß der 3. Typ A oder B enthalten, weil die Typ II - Antigene alle Agglutinine der Typ III-Antisera absorbieren und reziproke Absorption nicht stattfindet. Der 4. Typ muß einen Faktor enthalten, der in Typ I, aber nicht in II und III enthalten ist, er müßte entsprechend dem Schema also C sein. Der vom Schaf gewonnene Stamm hatte zu den 14 benützten bovinen Stämmen keine serologischen Beziehungen und wurde als Typ V (Y) bezeichnet.

Zur Beantwortung der Frage 2 wurden einige ausgewählte Stämme auf ihre Eignung als diagnostische Antigene geprüft. Dabei erwiesen sich drei Stämme als hochempfindlich gegen Vibrio-foetus-Agglutinine im Rinderserum. Einer dieser Stämme agglutinierte Normalrinderserum zu dem niedrigsten Titerwert und schien deshalb der geeignetste Standard-Stamm zu sein. Drei serologisch negative Stämme waren biochemisch den Vibrio-foetus-Stämmen ähnlich, aber sie bildeten im Gegensatz zu diesen Schwefelwasserstoff.

Lindquist (37) beschrieb das Vorkommen und die Isolierung einiger Vibrionenstämmen in den Genitalorganen des Rindes. Sie gehörten nicht zur Gruppe

Vibrio foetus, waren wenig infektiös und hatten eine andere Antigenstruktur als *Vibrio foetus*.

Zwei serologisch gut voneinander abgrenzbare Vibrionenarten wurden von Bryner und Frank (8) beschrieben. Sie untersuchten Vibrionen aus abortierten Foeten und Scheidenschleim von Kühen, sowie aus Samen und Praeputialspülproben von Bullen. Dabei kamen sie zur Unterscheidung zweier Vibrionentypen: Ein serologisch einheitlicher Typ wurde als der echte *Vibrio foetus* bezeichnet. Von dieser Art war ein anderer Typ serologisch zu unterscheiden, welcher weder Verwerfen noch Sterilität hervorgerufen hatte. In keinem Fall zeigten die aus *Vibrio-foetus*-Stämmen hergestellten Antigene wesentliche Kreuzagglutinationen mit Seren von saprophytären Vibrionen. Es reagierten auch nicht Antigene von saprophytären Vibrionen mit *Vibrio-foetus*-Antiserum. Innerhalb des saprophytischen Typs wurden zwei verschiedene Gruppen gefunden.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Hubrig und Wohanka (26). Sie stellten Vollantigene und Vollsera her aus isolierten Vibrionen-Stämmen von Foeten und vom Genitaltrakt der Rinder. Die Ergebnisse waren: Die mit Fötantigen hergestellten Seren agglutinierten die aus dem Genitaltrakt isolierten Vibrionen-Antigene mit wenigen Ausnahmen nicht, die Fötantigene wurden jedoch alle agglutiniert. Die Seren, hergestellt aus Vibrionen vom Genitaltrakt, agglutinierten wiederum die Fötantigene nicht, aber die Antigene aus Vibrionen vom Genitaltrakt. Bei den aus den Geschlechtsorganen der Rinder stammenden Vibrionen handelte es sich wahrscheinlich um apathogene Kulturen.

Untersuchungen von Mitscherlich und Forschner (43) führten zu folgendem Resultat: *Vibrio-foetus*-Stämme konnten nur durch Antiserum agglutiniert werden, die nach Immunisierung von Kaninchen mit *Vibrio-foetus*-Antigen gewonnen wurden. Apathogene *Vibrio-foetus*-Stämme wurden nur durch Antiserum agglutiniert, die mit apathogenen Stämmen gewonnen wurden.

Serologische Beziehungen von Vibrionenarten aus den Geschlechtsorganen der Rinder zu anderen Vibrionenarten werden von einigen Autoren erwähnt. So fand Messerli (40) keine serologischen Beziehungen von *Vibrio coli* zu *Vibrio foetus*. Ristic, Sanders, Young (54) isolierten 7 *Vibrio*-Stämme aus Foeten, zwei aus der Vagina des Rindes, fünf von Schafen, die verworfen hatten und drei menschenpathogene Stämme. Alle diese Kulturen hatten keine serologische Verwandtschaft mit einem Stamm, der von einem Schwein stammte (*Vibrio suis*).

Über die antigene Struktur der Vibrionen, besonders über *Vibrio foetus*, liegen nur wenige Arbeiten vor.

Smith und Orcutt (60) untersuchten 5 foetale und 2 Kälber-Stämme. Sie führten Agglutinationen mit Seren durch, die mit lebenden und erhitzten Kulturen hergestellt worden waren. Anhand der Versuchsergebnisse wurde auf 4 Typen von Antigenfaktoren geschlossen. Sie bezeichneten diese als

- 1.) gemeinsamen Vibrio-foetus-Faktor,
- 2.) Faktor der Kälbergruppe,
- 3.) Faktor der foetalen Gruppe,
- 4.) individuellen Stammfaktor.

Jeder der untersuchten Stämme sollte drei dieser Faktoren besitzen können. Der gemeinsame Vibrio-foetus-Faktor und die individuellen Stammfaktoren wurden thermolabil, der spezifische Faktor der Kälbergruppe und der foetalen Gruppe aber thermostabil sein.

Der von Florent (17) gefundene, saprophytisch beim Rind vorkommende *Vibrio bubulus* unterschied sich von *Vibrio foetus* durch seine antigene Struktur.

Juhler (30) untersuchte 21 Vibrio-foetus-Stämme im Agglutinationstest gegen Kaninchenantiserum. 18 dieser Stämme zeigten große serologische Ähnlichkeit, drei unterschieden sich von dieser Hauptgruppe und untereinander erheblich, so daß vier verschiedene serologische Gruppen festgestellt wurden. Die schwachen Kreuzreaktionen zwischen den Gruppen und die starken innerhalb der Hauptgruppe schrieb er dem H-Antigen zu.

Er isolierte auch die somatische Antigenkomponente (O-Fraktion), indem er die Bakterienabschwemmungen zwei Stunden kochte, um das H-Antigen zu zerstören, und mit dem so erhaltenen O-Antigen Kaninchenantiserum herstellte. Die Agglutinationen wurden nach 24 Std. Wasserbad bei 45-48° C abgelesen. Die Titerhöhen schwankten zwischen 80 und 10240. Er fand so vier verschiedene gruppenspezifische O-Antigengruppen. Eine Bevorzugung bestimmter Rassen oder Gegenden des Landes hinsichtlich der vier serologischen Vibrionentypen konnte er nicht feststellen.

Wiidik und Hlidar (70) haben sich einige Jahre mit der Herstellung von Vibrio-foetus Vollantigenen für serodiagnostische Untersuchungen beschäftigt. Dabei wiesen trotz gleichartiger Herstellungstechnik die von ihnen hergestellten Antigene Variationen im Agglutinationstiter gegen homologe Kaninchenantisera auf. Dabei wurde von einer wechselnden Empfindlichkeit der Antigenchargen gesprochen.

Bei der Untersuchung der antigenen Struktur der von ihnen verwendeten Stämme gingen sie folgendermaßen vor: Eine zu erwartende H-Agglutination ver-

suchten sie nach zwei Stunden im Wasserbad bei 50°C abzulesen. Die O-Agglutination beurteilten sie nach 20stündigem Brutschrankaufenthalt bei 37°C . Sie kamen zu folgenden Ergebnissen: Vibrio-foetus-Zellen enthalten in der Geißelsubstanz ein thermolabiles H-Antigen. Mengenmäßig ist es jedoch nur ganz gering an der Antigenstruktur der Vibrionen beteiligt. Dominierend ist das somatische, thermostabile O-Antigen. Außer diesen beiden Faktoren besitzt Vibrio-foetus einen Kapsel- oder K-Faktor. Dieses K-Antigen hemmt das Auftreten der O-Agglutination der lebenden oder formalinisierten Kultur im homologen O-Serum; Die Inagglutinabilität von lebenden oder formalinisierten Kulturen im homologen O-Serum und deren Agglutinabilität im homologen Voll-Antiserum, hergestellt mittels lebender oder formalinisierter Kultur sind als wichtigste Merkmale für das Vorhandensein eines Kapselantigens bei Vibrio foetus zu betrachten.

Dieses K-Antigen konnte nicht immer bei Erhitzen auf 100°C in 2 Std. zerstört werden, sicher aber durch Erhitzen der Kulturen im Autoklaven bei 120°C in 2 Stunden.

Über die Ablesung der Agglutination sagten sie folgendes: Bei Vibrio-foetus tritt nach 2 Std. im Wasserbad keine H-Agglutination auf, sondern eine kombinierte K- und O-Agglutination. Eine reine H-Agglutination ist bei der üblichen Technik nicht ablesbar. Die Agglutination von Vollantigen in Vollantiserum, nach 20 Std. bei 37°C beurteilt, ist eine gemischte O - K - H - Agglutination. Die maximalen Werte einer O-K-H-Agglutination konnten nach 20 Std. bei 50°C im Wasserbad abgelesen werden.

3.) Die diagnostische Bedeutung der Agglutinationsreaktion für die Vibriose der Rinder und Schafe

Für die Diagnose der Vibriose mittels Agglutinationstest wird bei Rindern vor allem der Vaginalschleim verwendet. Dieser weist zu bestimmten Zeiten spezifische Agglutinine auf, welche mit entsprechenden Antigenen nachgewiesen werden können. Die Bedeutung des Bluttiters bei Rind und Schaf für die Feststellung der Vibriose ist recht umstritten. Dabei ist die Höhe des Titers und die Zeit des Erscheinens der Agglutinine im Blut von Bedeutung.

Welsh und Marsh (69) berichteten, daß bei intravenöser Verimpfung von Vibrio-
nenmaterial ein Agglutinationstiter von 1 : 200 bald nach dem Verwerfen auftrat, einen Titer von 1 : 20 konnten sie noch 11 Wochen nach dem Abort feststellen. Ebenfalls berichteten Knuth und David (31) über einen Bluttiters von

1 : 200 bei Schafen, der auch durch Verimpfen infektiösen Materials hervorgerufen würde. Daneben fanden sie bei 9 Schafen einer natürlich infizierten Herde Titer von 1 : 50.

Ryff (56) berichtete über einen Agglutinationstest bei einer Herde von 79 Schafen, 25 von diesen Tieren hatten kürzlich verworfen und 10 von diesen agglutinierten das Vibrionenantigen bei einer Serumverdünnung von 1 : 100, 37 Tiere bei 1 : 25.

Blakemore und Gledhill (6) (7) sprechen von Bluttitern bei Schafen von 1 : 40 bis 1 : 160. Sie bemerkten, daß die Titer schnell in einer Zeitspanne von 14 bis 60 Tagen nach dem Verwerfen fallen. Es wurde gefolgert, daß der Agglutinationstest nicht verläßlich für die Diagnose der Vibriose sei.

Auf demselben Standpunkt steht Levi (35). Er testete Serum von Schafen, die verworfen hatten, wobei die Agglutinationstests mit denjenigen Stämmen die besten Resultate ergaben, welche die Infektion verursacht hatten.

Zusätzlich testete er 200 Normalrinderseren gegen 3 *Vibrio-foetus*-Stämme und fand Titer von 1 : 80 bis 1 : 160. Als Grenztiter für unspezifische Agglutinine nahm er somit 1 : 160 an.

Heff und Kaldahl (25) stellten fest, daß etwa 2 - 3 Monate nach dem Abort bei Schafen die Antikörper aus dem Blut verschwunden waren.

Marsh und Tunncliff (39) führten eine große Anzahl Agglutinationstests mit Serum von natürlich und künstlich infizierten Schafen durch. Sie stellten dabei verschiedene Titerwerte - oft sehr niedrige - im akuten Stadium der Infektion fest. Nach dem Abort sank der Titer rasch. Aus diesen Gründen maßen sie dem Agglutinationstest bei Schafen geringen Wert für die Kontrolle der Vibriose bei.

Günstiger wird die Serumagglutination für die Feststellung der Rindervibriose beurteilt.

Bell (3) berichtete, daß man in Virginia bei Vibrionenabort der Rinder mit den serologischen Nachweismethoden gute Ergebnisse erzielen konnte. Die Kühe, welche verworfen hatten, zeigten am 10. Tag nach dem Abort einen Titer von 1 : 800.

Moore (44) empfiehlt sogar zur Bekämpfung der Seuche die frühzeitige Feststellung durch Blutuntersuchung.

Gallut (20) fand 6 verschiedene (heterogene) Stämme unter 10 *Vibrio-foetus*-

Stämmen. Er schloß daraus, daß die Auffindung einer gemeinsamen *Vibrio*-foetus-Antigenfraktion Vorbedingung für eine spezifische serologische Diagnose sein müsse. Er berichtete über zwei Antigenfraktionen, von denen eine die meisten der verwendeten Stämme serologisch zu erfassen schien.

Price, Poelma und Faber (49) machten ebenfalls Angaben über ein diagnostisches Antigen. Für die Routine-Diagnostik-Tests mit Blutserum gaben sie folgende Werte an:

Vollständige oder unvollständige Agglutination
bei 1 : 100 = negativ;

Vollständige Agglutination bei 1 : 100 und
unvollständige bei 1 : 200 = verdächtig;

Vollständige Agglutination bei 1 : 200 und
höher = positiv.

Terpstra (62), wie auch Plastringe (47) beobachteten, daß das Blutserum von 4 Kühen 20 Tage nachdem sie von einem infizierten Bullen gedeckt worden waren einen positiven Titer aufwies, der sich aber nur einige Wochen hielt.

Flatla, Braend und Sudboe (16) berichteten, daß der Bluttitel 3 - 5 Monate nach dem Verkälben nachweisbar sei.

Ristic, Sanders und Tyler (53) gaben der Bestimmung des Vaginalschleim-Antikörpertiters den Vorzug vor der Blutserumagglutination, da die Vaginalschleim-agglutinine länger vorhanden seien als die Blutantikörper. Bei 9 von 10 Kühen, die verworfen hatten, wurden niedrige Bluttitelwerte durch Agglutination festgestellt. Bei 7 dieser Kühe war die Konglutinations-Komplementbindungsreaktion positiv. Die Serumagglutinine hielten sich zwischen 25 und 54 Tage nach dem Abort.

Nowak (46) konnte aus dem Fetus eines Jungrindes Vibrionen isolieren. Der Agglutinationstiter bei diesem Jungrind lag bei 1 : 400. Auch die Komplementbindungsreaktion zeigte ein positives Ergebnis.

Galassi (19) ist der Überzeugung, daß nur Titer von 1 : 400 und höher als positiv gewertet werden können; zweifelhaft sind Titer von 1 : 200, negativ 1 : 100 und darunter.

Die Ergebnisse der Agglutination werden gestört, wenn ein Rind zugleich mit *Trichimonas foetus* und *Vibrio foetus* infiziert ist (Vandeplassche (65)). *Trichimonas* hat mit *Vibrio foetus* eine Antigenfraktion gemeinsam. In vitro

verliert *Trichimonas foetus* schnell diesen gemeinsamen Antigenanteil (Florent (18)).

4.) Biochemische Differenzierung und Pathogenität der in den Geschlechtsorganen der Rinder vorkommenden Vibrionen

Es ist eine Streitfrage, ob und wie man *Vibrio foetus* von den anderen *Vibrio*-Arten unterscheiden kann (Vandeplassche (65)). Als Florent (17) saprophytische Vibrionen aus Genitalorganen von Rindern isolieren konnte, sprach er von einigen Eigenschaften dieser Vibrionenart: Im Gegensatz zu *Vibrio foetus* bildete *Vibrio bubulus* in Kulturen ausschließlich kurze Formen und bildete H_2S .

Bryner und Frank (8) untersuchten 164 Stämme aus abgetriebenen Foeten, Scheidenschleim von Kühen, sowie Samen und Vorhautspülungen von Bullen. Dabei ergab sich die Trennung von zwei Vibrionentypen auf der Grundlage der Katalase-Prüfung: Ein katalase-positiver Typ wurde als der echte *Vibrio foetus* bezeichnet. Er bildete keinen Schwefelwasserstoff und wuchs nicht in Tiefkulturen. Der katalasenegative Typ hatte weder Verwerfen noch Unfruchtbarkeit hervorgerufen. Er bildete H_2S in großer Menge und wuchs in Tiefkulturen. Beide Vibrionenarten hatten die biochemische Eigenschaft gemeinsam, Nitrate zu Nitriten zu reduzieren.

Auch Berthelou und Tournut (4) legten die spezifischen biochemischen Eigenschaften von *Vibrio foetus* dar. Hubrig und Wohanka (26) prüften 29 aus Rinderfoeten und 31 aus dem Genitaltrakt von Rindern stammende Vibrionen-Stämme. Die katalasenegativen und H_2S -positiven Vibrionen waren an einem Abort nicht beteiligt. Nur katalasepositive und H_2S -negative, also pathogene Vibrionen, schienen eine Antikörperbildung im Vaginalschleim anzuregen, denn nur sie gaben eine positive Mucoagglutination.

Weitere Unterscheidungsmerkmale zur Differenzierung der Vibrionentypen wurden herangezogen: Nach Vandeplassche (65) bildet *Vibrio foetus* kurze und lange Formen von 3-4 Wellen. Im pathologischen Material nach Aufbewahrung ist der Erreger unbeweglich. *Vibrio bubulus* ist sehr beweglich und bildet fast ausschließlich kurze Formen.

Nach Hubrig und Röhr (28) lassen sich die Koloniformen von *Vibrio foetus* auf Blutagar mit großer Sicherheit von Koloniformen apathogener Vibrionen unterscheiden.

Die Frage nach der Pathogenität der Vibrionen ist mit dem Kulturversuch allein nicht sicher zu beantworten. Meyn (41), sowie Hubrig und Wohanka (27) und Geerttler (23) sprechen davon, zusätzlich einen Infektionsversuch an der virginellen Fäse durchzuführen.

Für Laboratoriumsuntersuchungen sind außer bakteriologischen und biochemischen Unterschieden die serologischen Eigenschaften von großer Bedeutung.

C. Eigene Untersuchungen

I. Material und Methodik

Ia. Material

Für meine Untersuchungen standen mir eine Reihe von Vibrionenstämmen zur Verfügung. Zum Teil wurden diese vom Tierhygienischen Institut München isoliert, teils waren sie dem Tierhygienischen Institut von anderen Instituten freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden. Die Stammkulturen wurden im Institut in Leberbouillon gehalten. Über die Herkunft der Stämme gibt Tabelle 1 Auskunft.

Diese Vibrionenstämmen hielt ich ebenfalls auf Leberbouillon (Rinderleberbouillon). Alle drei Wochen wurden diese Kulturen erneut auf Röhrchen mit Leberbouillon überimpft. Nach zwei- bis dreitägiger Bebrütung bei 37° C wurden die Kulturröhrchen auf das Wachstum der Vibrionen geprüft, welches mikroskopisch festgestellt wurde. Es gehörte hierzu die Betrachtung einer Öse Materials im Dunkelfeld (Objektiv 45, Okular 8, sowie die Untersuchung mit dem Phasenkontrastmikroskop (Objektiv 100, Okular 8). Dabei war die lebhaft Beweglichkeit der Vibrionen meist gut zu erkennen.

Ib. Methodik

a) Antigenherstellung

Von den 33 Stämmen wurden Antigene auf festem Nährboden hergestellt. Als Nährsubstrate wurden dabei verwendet:

- 1) Thiolmedium nach Huddleson (Difco Labor.)
mit 2 % Agar-Zusatz,
- 2) Kochblutagar nach Levintal.

Zur Herstellung des Thiolnährbodens wurden 30 g Thiol mit 1000 ccm Aqua dest. bis zur Auflösung im Dampftopf erwärmt, 15 g Agar zugegeben und dann 15 Minuten autoklaviert (1 atü, 121° C). Der p^H-Wert wurde auf 7,2 eingestellt. Nach Abkühlen des Nährbodens auf 45 - 50° C wurden 2 % Serum zugesetzt.

Das Levintalagar wurde folgendermaßen hergestellt: Eine verflüssigte Mischung von 550 ccm Agar und 450 ccm Leberbouillon wurde auf 60 - 70° C abgekühlt und

T a b e l l e 1

Lfd. Nr.	Stamm	H e r k u n f t	Bezeichnung (isol. aus:)
1	P ₂	Veterinäruntersuchungs- amt Bonn	Foetus
2	Str. 37	Schweden	"
3	Bonn 6	Veterinäruntersuchungs- amt Bonn	"
4	NH 4	Reichsseruminstitut Gent	"
5	F 36	Jena, Tiergesundheitsamt	"
6	Bonn 146	Veterinäruntersuchungs- amt Bonn	"
7	800 V	Tiergesundheitsamt Jena	Vibrio bubulus
8	9801	Florent, Belgien	" "
9	63	Tierhygiene-Institut München	Praeputialspülprobe Bulle
10	128	" "	Mucoprobe Rind
11	N 5	" "	Sprungraum einer Be- samungsstation, in der Nähe des Notstandes
12	17	" "	Foetus
13	19	" "	"
14	20	" "	"
15	21	" "	"
16	24	" "	Kälberkot
17	26	" "	Jauche eines Schweine- stalles
18	27	" "	" " "

Fortsetzung Tabelle 1

Lfd. Nr.	Stamm	H e r k u n f t	Bezeichnung (isol. aus:)
19	61	Tierhygiene-Institut München	Praeputialspülprobe Bulle
20	62	" "	" "
21	65	" "	" "
22	68	" "	" "
23	69	" "	" "
24	70	" "	" "
25	71	Veterinäruntersuchungs- amt K i e l	Foetus
26	76	= Stamm F 37 Jena	"
27	79	Tierhygiene-Institut München	Besamungsstation in Nähe des Notstandes
28	80	= Stamm 721 V Jena	"Vibrio bubulus"
29	83	Tierhygiene-Institut München	Praeputialspülprobe Bulle
30	89	Reichsserum-Institut Gent	"Vibrio foetus"
31	103	Tierhygiene-Institut München	Jauche eines Schweine- stalles
32	V30	" "	" "
33	V41	" "	Schweinekot

5 % steriles Rinder- oder Hammelblut zugesetzt, dann im Dampftopf 8 Minuten gekocht und durch ein steriles Wattefilter filtriert. Anschließend wurden 1,5 % Serum und auf ein ccm Nährboden 50 Natriumthioglykolat zugesetzt.

Diese Nährböden wurden in Petrischalen ausgegossen, in jede Schale etwa 12 ccm Nährboden.

Zum Beimpfen der Nährmedien wurden 2-3 Tage alte, gut entwickelte und lebhaft bewegliche Vibrionenkulturen in Leberbouillonröhrchen verwendet. Mittels Kapillare wurde etwas Impfmateriel aus den Röhrchen aufgezogen und 2-3 Tropfen davon auf jede Platte gegeben. Mit einem Drigalskispatel wurde anschließend die Flüssigkeit auf der Nährbodenoberfläche verteilt. Die beimpften Nährböden wurden in Zeißler-Töpfe gebracht, dann wurde evakuiert und eine CO_2 -Atmosphäre von 15-20 % hergestellt. Nach 2-3 tägiger Bebrütung bei 37°C wurden die Töpfe geöffnet, wobei das zischende Einströmen der Außenluft den noch bestehenden Unterdruck im Gefäß anzeigte.

Die Vibrionenkolonien zeigten sich als nadelstichgroße, zarte, durchsichtige, weißliche bis gelbliche Kolonien, welche oft konfluierend wie ein Film die Nährbodenoberfläche bedeckten.

Der Verunreinigungsgrad war bei dieser Antigengewinnung hoch, so daß für die Antigenherstellung in größeren Mengen Kolle-Schalen verwendet wurden. Zu diesem Zweck wurden in jede Schale 70 - 80 ml Nährboden gegossen und die Flaschenöffnungen mit Wattepropfen fest verschlossen. Der anschließende 12-stündige Brutschrankaufenthalt sollte verunreinigten Nährboden ausschalten und gleichzeitig eine geeignete Trocknung der Nährbodenoberfläche ermöglichen.

Die Beimpfung des Nährbodens erfolgte wieder mit gut gewachsenen Vibrionenkulturen in Leberbouillonröhrchen. In jede Schale wurde der flüssige Inhalt eines Röhrchens gekippt. Gelangten Leberteile mit auf den Nährboden, so war dies nur von Vorteil, weil sich um die Leberteilchen die Vibrionenkolonien besonders üppig entwickelten. Die Flüssigkeit wurde nun durch leichtes Schwenken der Schalen auf die Nährbodenoberfläche verteilt. Die so beimpften, gut verschlossenen Kolle-Schalen wurden im Anaerobier-Schrank unter niedriger Sauerstoffspannung (400 mm Hg) mit 15 - 20 % Kohlensäure bei 37°C bebrütet.

Nach 60 - 72 Stunden wurden die Schalen herausgenommen. Eine längere Bebrütung erwies sich als unzweckmäßig, da sich dann die Vibrionen zu Granuliformen entwickelt hatten. Dann wurde der Nährboden mit steriler physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt. Die so gewonnene Bakterienaufschwemmung wurde im Phasenkontrastmikroskop (Objektiv 100 x, Okular 8 x) geprüft. Die

Vibrionen zeigten sich meist in ihren typischen Zickzack-Bewegungen. Zur Untersuchung der Vibrionenkulturen wurde außerdem die Färbung nach Gram herangezogen.

Die Bakteriensuspensionen wurden nun durch sterile Watte filtriert und das Filtrat bei 5500 U/min. 30 Minuten lang zentrifugiert. Die überstehende klare Flüssigkeit wurde abgossen und die Bakterienmasse in physiologischer Kochsalzlösung durch intensives Schütteln im Schüttelapparat resuspendiert. Auf diese Weise wurde ein reines, weißes Antigen gewonnen.

Das Antigen wurde auf eine solche Dichte eingestellt, daß ein Tropfen Aufschwemmung zu einem ccm Serumverdünnung zugesetzt, einer Bariumsulfataufschwemmung von ein ccm 1 % Bariumchloridlösung auf 99 ccm 1 % Schwefelsäure entsprach. Als Immunisierungsantigen wurde das auf diese Weise gewonnene Antigen verwendet, für Agglutinationszwecke wurde solches Antigen mit 0,3 % Formalin konserviert (1 ccm 3 % Formalin auf 10 ccm Antigen).

b) Herstellung der Antiseren

Zwölf Stämme wurden ausgewählt, um Antiseren zu gewinnen. Zur Herstellung der Antiseren wurden zwölf Kaninchen mit den oben beschriebenen Immunisierungsantigenen geimpft. Jedes Kaninchen wurde mit einem bestimmten Antigenstamm immunisiert. Die Injektion erfolgte bei den ersten drei Dosen intravenös in die Ohrtrandvene, bei nachfolgenden Injektionen wurde eine Hälfte der Dosis intravenös, die andere Hälfte intramuskulär gegeben.

Die verabreichten Mengen Antigen waren:

1. Dosis	0,5 ccm	4. Dosis	3,0 ccm
2. Dosis	1,0 "	5. Dosis	4,0 "
3. Dosis	2,0 "		

Zwischen den einzelnen Injektionen lag immer ein Zeitintervall von 4 - 5 Tagen. Das Allgemeinbefinden der Versuchstiere blieb dabei unverändert. Vier Tage nach der 5. Dosis wurden aus der Ohrtrandvene der Kaninchen etwa 2 - 3 ccm Blut mit einer Rekordspritze entnommen, um festzustellen, ob eine genügende Titerhöhe des Serums gegeben war.

Nach dem Absetzen des Blutkuchens wurde das Serum durch Zentrifugieren bei 2500 U/min. gewonnen. Jedes Serum untersuchte ich in der Schnell- und Langsamagglutination mit dem homologen Agglutinationsantigen. War der Titer genügend hoch, wurden die betreffenden Kaninchen aus der Carotis entblutet.

Das Blut wurde dann zwei Stunden im Brutschrank aufbewahrt und anschließend 25 Minuten bei 2500 U/min. zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde nun mit 0,005 % Cialit konserviert. Dazu stellte ich 50-prozentiges Glycerinwasser her und versetzte dieses mit 0,05 % Cialit. Von dieser Mischung gab ich 1 ccm auf 10 ccm Serum.

c) Ausführung der Agglutinationen

1. Serumschnellagglutination

Eine Serumverdünnung von 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung wurde hergestellt. Ein Tropfen dieser Verdünnung von jedem Serum wurde mit einem Tropfen Agglutinationsantigen auf einem Objektträger zusammengebracht und die Reaktion unter leichtem Schwenken auf dunklem Untergrund oder auf einem Spiegel nach folgendem Schema beurteilt:

- +→ = sofortige Agglutination innerhalb 10 Sekunden,
grobe Flockung bei völliger Klärung;
- + = Agglutination erst nach 10 Sekunden,
feine Flockung bei leichter Trübung;
- = negativ, homogene Trübung.

2. Serumlangsamagglutination

Es wurde eine Serum-Grundverdünnung von 1 : 20 hergestellt (0,1 ccm Serum auf 1,9 ccm Kochsalzlösung). In die folgenden Widalröhrchen wurde jeweils 1 ccm Kochsalzlösung eingefüllt. Nun wurde von der gründlich durchmischten Grundverdünnung im ersten Röhrchen 1 ccm ins folgende Gläschen überpipettiert, dort wieder gemischt, überpipettiert und so eine fallende Serumverdünnung von 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80, 1 : 160 etc. hergestellt.

In jedes Röhrchen wurde nun 1 Tropfen Agglutinationsantigen gegeben und durch Schütteln homogen verteilt. Zur Kontrolle wurde in ein Röhrchen mit 1 ccm Kochsalzlösung 1 Tropfen Antigen gegeben und zu einem anderen Röhrchen mit Normalserum von Kaninchen ebenfalls 1 Tropfen Antigen zugesetzt.

Nach einer bestimmten Reaktionszeit bei einer bestimmten Temperatur wurde der Ausfall der Reaktion nach folgendem Schema beurteilt:

- +++ = grobe Flockung bei völliger Klärung;
- ++ = grobe Flockung bei leichter Trübung;
- + = in Trübung noch eben sichtbare Flockung;
- = völlige homogene Trübung.

II. Versuche und Versuchsergebnisse

1.) Serumschnellagglutination

Die Antigene der 33 Vibrionenstämme prüfte ich mit den 12 Antiseren im Objektträgerschnelltest auf Agglutination. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die Tabelle 2 zeigt, daß 3 Gruppen von Vibrionenstämmen serologisch zu unterscheiden sind:

Gruppe I:

Nur solche Antigene, welche aus von Foeten stammenden Vibrionen hergestellt wurden, werden - mit einigen Ausnahmen - von Antiseren agglutiniert, die ebenfalls mit Hilfe von Foetvibrionen gewonnen wurden. Als Ausnahmen dieser Regel sind zu betrachten: Stamm 19 mit Serum Bonn 146, Stamm 20 mit Serum P₂ und Stamm 21 mit den Seren P₂, F 36 und Bonn 146 zeigten keine Reaktion.

Die Foetantigene lassen sich nicht mit Seren agglutininieren, welche nicht mit Foetvibrionen hergestellt wurden.

Gruppe II:

Weitere 11 Stämme, welche meist aus Praeputialspülproben von Bullen stammten, werden nur von den Seren agglutiniert, die von Kaninchen nach Vorbehandlung mit Vibrionen aus Praeputialspülproben bzw. mit *Vibrio bubulus* gewonnen wurden. Mit anderen Seren geben diese Stämme keine Agglutination. Ausnahmen bildeten Stamm 61 mit Serum 63 und Stamm 62 mit Serum 800 V, welche keine Agglutination zeigten.

Gruppe III:

9 weitere Vibrionenstämme stammen teils aus dem Sprungraum einer Besamungsstation, teils wurden sie aus Scheidenschleim vom Rind, aus Kälber- oder Schweinekot und aus Jauche isoliert. Sie reagieren nicht mit heterologen Seren.

T a b e l l e 2

Serumschnellagglutination

Gruppe I

Antigen	Antiserum						(Verdünnung 1 : 10)					
	P ₂	Str. 37	B6	NH 4	F 36	Bonn 146	800V	9801	63	N5	128	
P ₂	++	++	+	++	++	+	-	-	-	-	-	
Str.37	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
B 6	+	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	
NH 4	+	+	++	++	++	++	-	-	-	-	-	
F 36	+	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	
Bonn 146	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	
17	+	++	+	++	++	+	-	-	-	-	-	
19	+	++	+	+	++	-	-	-	-	-	-	
20	-	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
21	-	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
71	+	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	
76	+	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	
89	+	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	

2.) Serumlangsamagglutination

Die Ablesung der Serumlangsamagglutination bei Vibrionen wurde gemäß den Angaben der Literatur bisher nicht einheitlich durchgeführt. Die Werte wurden teils nach einem Brutschrankaufenthalt, teils im Wasserbad abgelesen. Es differieren auch die Angaben über die Zeit der Ablesung nach Ansetzen der Versuche.

Ich führte deshalb Untersuchungen durch, um die Methode zu finden, welche es gestattet, klare und gut ablesbare Ergebnisse für Vergleichszwecke zu bekommen. Hierzu führte ich Serumlangsamagglutinationen mit einigen ausgewählten Antigenen und Antiseren aus. Die Ablesung der Ergebnisse wurde folgendermaßen vorgenommen:

- a) nach einem Brutschrankaufenthalt bei 37°C von 20 Stunden,
- b) nach einem Wasserbadaufenthalt bei 50°C von 2 Stunden.

Innerhalb dieser beiden Versuchsbedingungen veränderte ich als weiteren Faktor die Elektrolytkonzentration. Ich führte also obengenannte Versuchsreihen durch mit

- a) 0,85 %iger (physiologischer) Kochsalzlösung und
- b) 5,0 %iger Kochsalzlösung.

Bei der Ablesung war sowohl nach dem Brutschrankaufenthalt von 20 Stunden als auch nach dem Wasserbad die Art der Agglutination eine gemischte, also feinkörnig und flockig. Bei der Agglutination im Brutschrank überwog der feinkörnige, im Wasserbad mehr der flockige Anteil.

- a) Die Ablesung nach 20stündigem Brutschrankaufenthalt bei 37°C : (Tabellen: 3a, 3b, 4)

Die Tabellen zeigen, daß die Endtiterwerte mit der 0,9 %igen Kochsalzlösung als Elektrolyt hoch sind. Sie liegen meist bei einer Serumverdünnung zwischen 1 : 2560 und 1 : 81920. Die höchsten Endtiterwerte werden nicht immer mit dem homologen Serum erreicht. Die erhaltenen Werte bei 0,9 % NaCl-Lösung als Elektrolyt gehen langsam mit steigender Verdünnung von +++ zu minus über. Die Titergrenze ist oft nicht genau festzustellen (+). Die Endtiterwerte liegen um 1 bis 5 Verdünnungsgrade höher als bei der 5 %igen Kochsalzlösung. Die Titergrenze bei der 5 %igen Kochsalzlösung ist deutlich abgesetzt: Nach einem Wert von +++ oder ++ folgt negative Reaktion. Die Agglutinationsreaktion ist bei dieser Elektrolytkonzentration weniger empfindlich.

Tabelle 3a
Serumlangsamagglutination (20 Std. 37° C Brutschrank)

Antiserum	Antigen	NaCl-Lösg. %	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2560}$	$\frac{1}{5120}$	$\frac{1}{10240}$	phys. NaCl	Normalserum Kaninchen
P ₂	P ₂	0,9	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	0	0	0	0
P ₂	P ₂	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0
P ₂	Str. 37	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	0	0	0	0	0
P ₂	Str. 37	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0
P ₂	B6	0,9	+++	+++	+++	+++	+	+	+	0	0	0	0	0
P ₂	B6	5,0	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
P ₂	NH4	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	0	0
P ₂	NH4	5,0	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
P ₂	F 36	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	0	0
P ₂	F 36	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	+	0	0	0	0	0	0
P ₂	Bonn 146	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	0	0
P ₂	Bonn 146	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	0	0	0	0	0

T a b e l l e 3b

Serumlangsamagglutination (20 Std. 37° C Brutschrank)

Antiserum Antigen	NaCl-Lösg.	%														Kom- trolien
		1 20	1 40	1 80	1 160	1 320	1 640	1 1280	1 2560	1 5120	1 10240	1 20480	1 40960	1 81920		
Bonn 146	P ₂	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-		
Bonn 146	P ₂	5,0	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Bonn 146	Str. 37	0,9	+++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-		
Bonn 146	Str. 37	5,0	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-		
Bonn 146	B 6	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+		
Bonn 146	B 6	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-		
Bonn 146	NH 4	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-		
Bonn 146	NH 4	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-		
Bonn 146	F 36	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-		
Bonn 146	F 36	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-		
Bonn 146	Bonn 146	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-		
Bonn 146	Bonn 146	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-		
Bonn 146	Bonn 146	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-		
Bonn 146	Bonn 146	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-		

Tabelle 4

Serumlangsamagglutination (20 Std. 37° C Brutschrank)

Antiserum	Antigen	NaCl-Lsgg.	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2560}$	$\frac{1}{5120}$	$\frac{1}{10240}$	$\frac{1}{20480}$	$\frac{1}{40960}$	$\frac{1}{81920}$	$\frac{1}{163840}$	Korrollen
800 V	800 V	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-
800 V	800 V	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
800 V	980 I	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-	-	-	-
800 V	980 I	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-
980 I	800 V	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-	-	-
980 I	800 V	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-
980 I	980 I	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-
980 I	980 I	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-

b) Die Ablesung nach einem Wasserbadaufenthalt von 2 Std. bei 50° C:

(Tabellen: 5a, 5b, 5c, 6)

Die Endtiter liegen niedriger als die Titer bei der Beurteilung nach dem Brutschrankaufenthalt. Die Titerwerte mit 0,9 %iger Kochsalzlösung sind gut abzulesen; die Agglutinationswerte bei hoher Verdünnung des Serums verlaufen schnell von +++ zu minus. Die Ergebnisse mit 0,9 %iger Kochsalzlösung liegen hier hinsichtlich des Endtiters fast auf der gleichen Höhe wie die mit 5 %iger NACL-Lösung, jedoch nicht höher als 3 Verdünnungsgrade. Die Endtiter mit 5,0 % NACL-Lösung sind nicht so scharf abgesetzt wie bei der Beurteilung nach dem Brutschrankaufenthalt bei gleicher Elektrolytkonzentration, sie gehen vielmehr von +++ über ++ und + zu minus über.

Um zu guten Vergleichswerten für die serologischen Reaktionen der Vibrionenstämmen zu kommen, gab ich der Ablesung der Agglutinationen nach einem zweistündigen Aufenthalt im Wasserbad bei 50° C den Vorzug. Ich führte alle weiteren Langsamagglutinationen unter dieser Bedingung mit 0,9 %iger Kochsalzlösung durch. Diese Methode gewährleistete eine genügend empfindliche Reaktion, aber die Ergebnisse waren dabei gut und deutlich abzulesen.

Die Kontrollen mit Kochsalzlösung und Antigen, sowie mit Normalserum von Kaninchen und Antigen waren immer negativ, es fand keine Agglutination statt.

Gleichzeitig ausgeführte Agglutinationsversuche mit Antigenchargen, welche zu verschiedenen Zeiten, aber unter annähernd gleichen Bedingungen hergestellt worden waren, zeigten in einigen Fällen unterschiedliche Titerwerte. Die Werte differierten im Durchschnitt um zwei Verdünnungsgrade. Das läßt auf eine wechselnde Empfindlichkeit der Vibrionen-Antigene schließen, worauf schon Wiidik und Hlidar (70) hingewiesen hatten.

Die Endtiter der Serumlangsamagglutinationen (bei +), abgelesen nach einem Wasserbadaufenthalt bei 50° C von 2 Stunden, wurden in Tabellen zusammengefaßt.

Tabelle 7 zeigt die Endtiter der Agglutinationen von Gruppe I: Die Antigene werden von den Seren teils mit hohen, teils mit niedrigen Titern agglutiniert, in einigen Fällen findet keine Agglutination statt. Die Antigene liefern nicht immer mit dem homologen Serum - soweit vorhanden - den höchsten Titerwert.

Das Antigen Str. 37 wird von allen Antiseren, außer mit dem homologen Serum, zu sehr niedrigen Titern agglutiniert. Die Stämme 17, 19, 20, 21 werden von den Antiseren ebenfalls mit niedrigen Titern oder teilweise überhaupt nicht

Tabelle 5a
Serumlangsamagglutination (2 Std. 50° C Wasserbad)

Antiserum	Antigen	NaCl-Lösg. %	1 20	1 40	1 80	1 160	1 320	1 640	1 1280	1 2560	1 5120	phys. NaCl	Normalserum Kaninchen
P ₂	P ₂	0,9	+++	+++	+++	+++	++	+	0	0	0	0	0
P ₂	P ₂	5,0	+++	+++	+++	++	+	0	0	0	0	0	0
P ₂	Str. 37	0,9	+++	+++	+++	+++	++	+	0	0	0	0	0
P ₂	Str. 37	5,0	+++	+++	+++	+++	++	+	0	0	0	0	0
P ₂	B 6	0,9	++	+	-	-	-	0	0	0	0	0	0
P ₂	B 6	5,0	+	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
P ₂	NH 4	0,9	+++	++	++	-	-	0	0	0	0	0	0
P ₂	NH 4	5,0	++	++	+	-	-	0	0	0	0	0	0
P ₂	F 36	0,9	+++	+++	+++	++	+	0	0	0	0	0	0
P ₂	F 36	5,0	+++	++	+	-	-	0	0	0	0	0	0
P ₂	Bonn 146	0,9	+++	+++	+++	+++	++	+	0	0	0	0	0
P ₂	Bonn 146	5,0	+++	+++	+++	+++	++	0	0	0	0	0	0

T a b e l l e 5b
Serumlangsamagglutination (2 Std. 50° C Wasserbad)

Antiserum	Antigen	NaCl-Lösg. %	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2560}$	$\frac{1}{5120}$	$\frac{1}{10240}$	Kontrollen
			20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	
Str. 37	P ₂	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
Str. 37	P ₂	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-
Str. 37	Str. 37	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
Str. 37	Str. 37	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
Str. 37	B 6	0,9	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
Str. 37	B 6	5,0	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-
Str. 37	NH 4	0,9	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-	-
Str. 37	NH 4	5,0	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
Str. 37	F 36	0,9	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
Str. 37	F 36	5,0	+++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
Str. 37	Bonn 146	0,9	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
Str. 37	Bonn 146	5,0	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-

Tabelle 5c

Serumlangsamagglutination (2 Std. 50° C Wasserbad)

Antiserum	Antigen	NaCl-Lösg. %	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2560}$	$\frac{1}{5120}$	Kontrollen
Bonn 146	P ₂	0,9	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
Bonn 146	P ₂	5,0	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Bonn 146	Str. 37	0,9	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bonn 146	Str. 37	5,0	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bonn 146	B 6	0,9	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
Bonn 146	B 6	5,0	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-
Bonn 146	NH 4	0,9	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
Bonn 146	NH 4	5,0	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
Bonn 146	F 36	0,9	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
Bonn 146	F 36	5,0	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-	-
Bonn 146	Bonn 146	0,9	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
Bonn 146	Bonn 146	5,0	+++	+++	++	++	++	-	-	-	-	-

Tabelle 6
Serumlangsamagglutination (2 Std. 50° C Wasserbad)

Antiserum	Antigen	NaCl-Lösung %														Kon- trol-
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
800 V	800 V	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
800 V	800 V	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
800 V	9801	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
800 V	9801	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
800 V	63	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
800 V	63	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
9801	800 V	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
9801	800 V	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
9801	9801	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
9801	9801	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
9801	63	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
9801	63	5,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

T a b e l l e 7

Endtiterwerte der Serumlangsamagglutination

Ablesung nach 2 Std. 50° C Wasserbad

(Reziproker Wert der höchsten Verdünnung mit + Agglutination)

Gruppe I

A n t i g e n	A n t i s e r u m					
	P ₂	Str. 37	B 6	NH 4	F 36	Bonn 146
P ₂	640	2560	160	640	2560	80
Str. 37	320	5120	160	40	40	20
B 6	40	640	20480	20480	10240	1280
NH 4	80	320	10240	10240	10240	640
F 36	320	640	10240	10240	10240	640
Bonn 146	640	640	10240	40960	10240	640
17	160	2560	320	640	640	320
19	320	2560	80	160	640	0
20	0	640	160	80	320	80
21	0	640	320	160	0	0
71	320	2560	5120	5120	5120	320
76	20	1280	20480	40960	20480	40
89	40	640	10280	81920	10240	320

agglutiniert. Mit Serum von Str. 37 geben sie stets die höchsten Titerwerte. Es wird vermutet, daß Str. 37 und diese 4 Stämme ähnliche antigene Eigenschaften besitzen.

Bemerkenswert hohe Titer liefern die Seren der Stämme B 6, NH 4 und F 36 mit den aus diesen Stämmen hergestellten Antigenen, sowie mit den Antigenen Bonn 146, 71, 76 und 89.

In Tabelle 8 sind die Endtiter der Agglutinationen von Gruppe II zusammengefaßt: Im allgemeinen sind die Titerwerte ausgeglichener. Serum 87 liefert nicht mit dem homologen Antigen, sondern mit einem heterologen den höchsten Titerwert.

Gruppe III: Die Stämme der Gruppe III reagieren mit keinem Antiserum, außer mit dem homologen. Die Endtiterwerte (+) mit dem homologen Serum sind:

<u>Stamm</u>	<u>Titerwert</u>
N 5	5120
1 2 8	5120
V 41	2560

Diese Stämme haben somit keine serologischen Beziehungen untereinander, als auch nicht zu den Stämmen der beiden anderen Gruppen.

3.) Serumabsättigungsversuche

Um gemeinsame Antigenfraktionen bei Gruppe I und solche bei Gruppe II festzustellen, führte ich Absorptionen durch. Dazu wählte ich aus Gruppe I ein Serum, welches alle Stämme dieser Gruppe serologisch erfaßte, beispielsweise Bonn 6. Aus Gruppe II wurden drei Seren zur Absättigung herangezogen. Nun stellte ich eine für die Absättigung brauchbare Verdünnung der Seren her.

Die zur Absättigung verwendeten Antigene wurden bei 4000 U/min. zentrifugiert, und die über dem Zentrifugat stehende klare Flüssigkeit wurde abgossen. Ein Teil der in der Zentrifugenröhrchenkuppe befindlichen Bakterien wurde in der Serumverdünnung unter starkem Schütteln suspendiert, bis eine homogene Trübung eingetreten war. Die mit Antigen versetzten Seren wurden nun 20 Std. bei 37° C in den Brutschrank gestellt. Hatte sich das agglutinierte Antigen zu Boden gesetzt, und war die Trübung des Serums bestehen geblieben, so war die Absättigung beendet. War dagegen das Serum über den abgesetzten Bakterienzusammenballungen noch klar, mußte die Absättigung fortge-

T a b e l l e 8

Endtiterwerte der Serumlangsamagglutination

Ablesung nach 2 Std. 50° C Wasserbad

(Reziproker Wert der höchsten Verdünnung mit + Agglutination)

Gruppe II

Antigen	A n t i s e r u m		
	800 V	9801	63
800 V	81920	1280	5120
9801	2560	5120	80
63	40960	1280	10240
61	40960	5120	0
62	0	2560	5120
65	1280	320	10240
68	1280	160	10240
69	2560	20480	2560
70	5120	5120	5120
80	10240	5120	2560
83	1280	1280	5120

setzt werden, bis alle auf das betreffende Antigen ansprechenden Agglutinine abgesättigt waren und das Serum getrübt blieb. Als dieser Zustand erreicht war, wurden die abgesättigten Seren scharf zentrifugiert (5500 U/min., etwa 1 Stunde). Das über dem Zentrifugat befindliche, nun wieder klare Serum wurde zur Schnellagglutination verwendet.

Die Beurteilung der Agglutination wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- +++ = sofortige völlige Zusammenballung der Bakterien bei völliger Klärung;
- ++ = Zusammenballung bei leichter Trübung;
- + = noch erkennbare Zusammenballung bei stärkerer Trübung;
- = völlige homogene Trübung.

Die Ergebnisse sind aus Tabelle 9 zu ersehen:

Durch die Absättigung der Seren gab es mit einigen Antigenen teils keine Agglutination mehr, teils waren die Agglutinationsreaktionen abgeschwächt.

Gruppe I: (Tabelle 9a) Das mit Antigen P₂ abgesättigte Serum B 6 agglutinierte die Stämme 17 und 19 nicht mehr. Gemeinsame Antigenkomponenten sind hier vorhanden. Auffallend ist die Tatsache, daß durch die Absättigung mit Str. 37 die vier Antigene 17, 19, 20, 21 nicht mehr agglutiniert wurden. Da gemeinsame Agglutinine beseitigt wurden, bestätigt dies die schon geäußerte Vermutung von der antigenen Verwandtschaft dieser vier Stämme mit Strain 37.

Das mit Antigen NH 4 abgesättigte Serum B 6 agglutinierte Stamm 89 nicht mehr. Auch das mit Antigen F 36 abgesättigte Serum reagierte mit Stamm 76 nicht. Gemeinsame Antigenanteile sind also vorhanden bei den Stämmen NH 4 und 89, sowie bei F 36 und 76. Das Vorhandensein gemeinsamer Antigenkomponenten bei diesen Stämmen und Bonn 6 ist ebenfalls anzunehmen. Serum Bonn 6, welches mit Antigen Bonn 146 abgesättigt wurde, reagierte nicht mit Stamm Bonn 6 und auch nicht mit den Stämmen 71, 76, 89. Hier sind ebenfalls gemeinsame Antigenanteile zu vermerken.

Gruppe II: (Tabelle 9b). Durch Absorption der Agglutinine von Serum 63 mit Antigen 9801 wird gleichzeitig die Agglutination von Stamm 70 mit dem abgesättigten Serum aufgehoben.

Durch Beseitigung der Agglutinine von Stamm 63 in Serum 9801 fand ebenfalls keine Agglutination mehr mit den Stämmen 62, 65, 68 und 83 statt. Die fünf

Tabelle 9a

Schnellagglutination mit abgesättigtem Serum

Gruppe I

Antigen	Serum B 6, abgesättigt mit Stamm				
	P ₂	Str. 37	NH 4	F 36	Bonn 146
P ₂	-	++	+	+	+
Str. 37	+	-	+	+	+
B 6	++	++	++	+	-
NH 4	+++	++	+	+	++
F 36	++	++	+	-	+
Bonn 146	+++	+++	++	++	-
17	-	-	+	+	+
19	-	-	+	+	+
20	+	-	+	+	+
21	+	-	+	+	+
71	+	++	++	++	-
76	+	+	+	-	-
89	++	+	-	+	-

T a b e l l e 9b

Schnellagglutination mit abgesättigtem Serum

Gruppe II

Antigen	Serum 800 V abgesättigt mit Stamm 9801	Serum 63 abgesättigt mit Stamm 9801	Serum 9801 abgesättigt mit Stamm 63
800 V	++	+	++
9801	-	-	++
63	++	+++	-
61	++	-	+
62	-	+	-
65	++	++	-
68	+	++	-
69	++	+	++
70	++	-	++
80	+++	+	++
83	+	+	-

Stämme 62, 63, 65, 68 und 83 könnten so zu einer Gruppe mit gemeinsamen Antigenfraktionen zusammengefaßt werden.

4.) Agglutinationsreaktionen mit hitzebehandelten Antigenen

Zur Untersuchung von thermostabilen und thermolabilen Antigenfraktionen erhitze ich einige Stämme zwei Stunden lang bei 100°C . Um zu einem Vergleich der Endtiterwerte zu kommen, führte ich Agglutinationen mit erhitzten Antigenen und ihren homologen Seren durch und las die Werte nach einem Brutschrankaufenthalt von 20 Stunden ab. Die erhaltenen Titerhöhen stellte ich den Werten gegenüber, die ich mit nicht erhitzten Antigenen bekommen hatte.

Aus Tabelle 10 ist zu ersehen, daß die Titerwerte mit nicht erhitzten Antigenen wesentlich höher liegen als solche, die ich mit erhitzten Antigenen erhielt.

Die hitzebehandelten Stämme untersuchte ich nun im Objektträger-Schnelltest mit den Antiseren auf Kreuzreaktionen, wobei die Beurteilung folgendermaßen erfolgte:

- ++ = starke Agglutination, keine oder schwache Trübung;
- + = schwache Agglutination, stärkere Trübung;
- = völlige Trübung.

Die Ergebnisse in der Tabelle 11 zeigen, daß bei den in begrenzter Anzahl vorgenommenen Schnelltests der Gruppe I in nur vier Fällen keine Agglutination auftrat. Antigen 37 zeigte in 2 Fällen keine Agglutination mit den Seren P_2 und NH 4, und Serum P_2 reagierte nicht mit den hitzebehandelten Antigenen NH 4 und 89.

Innerhalb der Gruppe II lassen sich zwei Abteilungen von Stämmen unterscheiden. Die eine Abteilung, welche die Stämme 62, 63, 65, 68, 83 umfaßt, ist streng von der anderen Abteilung mit den Stämmen 800 V, 9801, 61, 69, 70, 80 getrennt. Die Einteilung kann auf Grund gemeinsamer hitzestabiler Antigenfraktionen vorgenommen werden.

5.) Prüfung einiger Vibrio-foetus-Stämme mit Normalrinderserum

Mit der Serumlangsamagglutination untersuchte ich einige Vibrionenstämme, welche aus Foeten isoliert worden waren, auf ihre Empfindlichkeit gegenüber

T a b e l l e 10

Serumlangsamagglutination erhitzter und nichterhitzter Antigene mit homologen Seren
20 Std. 37° C Brutschrank

Antiserum	Antigen-Behandlung		Endtiter *)
NH 4	NH 4	nicht erhitzt	163840
NH 4	NH 4	2 Std. 100° C	640
B 6	B 6	nicht erhitzt	163840
B 6	B 6	2 Std. 100° C	1280
800 V	800 V	nicht erhitzt	81920
800 V	800 V	2 Std. 100° C	2560
9801	9801	nicht erhitzt	40960
9801	9801	2 Std. 100° C	640

*) Reziproker Wert der höchsten Verdünnung mit + Agglut.

T a b e l l e 11

Serumschnellagglutination mit erhitzten Antigenen (2 Std. 100° C)

Gruppe I

Antigen	A n t i s e r u m					
	P ₂	Str. 37	B 6	NH 4	F 36	Bonn 146
P ₂	+	+	+	+	+	+
Str. 37	-	++	+	-	+	+
B 6	+	++	++	++	++	++
NH 4	-	+	++	++	++	+
17	+	++	+	+	+	+
89	-	++	++	++	++	++

Gruppe II

Antigen	A n t i s e r u m		
	800 V	9801	63
800.V	++	++	-
9801	++	++	-
63	-	-	++
65	-	-	++
68	-	-	++
62	-	-	+
83	-	-	+
70	+	++	-
80	++	++	-
61	++	++	-
69	++	++	-

Normalagglutinin im Rinderserum. Dabei ging ich von der Vermutung aus, daß das verwendete Rinderserum keine spezifischen Vibrio-foetus-Agglutinine enthielt, trotzdem ein Vorbericht nicht vorhanden war.

Die Ablesung der Agglutinationsreaktion erfolgte nach 20 Stunden Brutschrankaufenthalt. Dabei fand ich drei der untersuchten Stämme mit hoher Empfindlichkeit gegenüber Normalagglutinin (B6, F 36, NH 4). Sie reagierten noch bei einer Serumverdünnung von 1 : 320 oder 1 : 640. Drei weitere Stämme (P₂, Strain 37, Bonn 146) wurden von dem Rinderserum zu weniger hohen Titerwerten agglutiniert (1:160, 1:40, 1:80).

6.) Biochemische Differenzierung der Vibrionenstämme

Die Vibrionenstämme wurden nun auf eine Katalasereaktion und auf Schwefelwasserstoffbildungsvermögen untersucht.

a) Katalaseprobe

Sämtliche Vibrionenstämme wurden in Röhrchen mit Thiolmedium, dem 0,1 % Agar zugesetzt worden war, überimpft und drei Tage bei 37° C bebrütet. Die gut entwickelten Vibrionenkulturen in dem halbfesten Nährboden wurden mit 1 %iger Wasserstoffsuperoxydlösung in der Menge des Nährbodens überschichtet. Die Röhrchen waren dann etwa zu 2/3 gefüllt. Nun wurden sie mit Gummipropfen, durch deren Bohrung ein Kapillarröhrchen geführt war, fest verschlossen und umgekehrt über einem Behälter aufgestellt. Die Höhe der Flüssigkeitssäule (aus Nährboden und H₂O₂) wurde mit einem Farbstift am Glas markiert, um die Stärke der Katalasebildung beurteilen zu können.

Sofort nach Überschichtung der Kulturen mit Wasserstoffsuperoxyd bildete sich im Röhrchen bei positiver Reaktion unter heftigem Schäumen Sauerstoffgas, das die Flüssigkeit aus dem Glas verdrängte.

Bei negativer Reaktion fand keine Gasentwicklung statt, und daher wurde auch keine Flüssigkeit durch die Kapillare gedrückt. Die Beurteilung der Probe erfolgte 15 Minuten nach Ansetzen des Versuches.

b) Schwefelwasserstoffbildung

Zur Prüfung einer Schwefelwasserstoffbildung der verwendeten Vibrionenstämme wurde Eisenagar nach Kligler verwendet. Herstellung des Nährbodens: Als Grundsubstanz diente 1,5 %iger Nähragar mit Witte-Pepton. Der Agar wurde verflüssigt, auf 60° C abgekühlt und auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Zur Klärung des Agars wurde das schaumig geschlagene Eiweiß eines Hühnereies ver-

T a b e l l e 12

Serumlangsamagglutination einiger Vibrio-Stämme mit Normalrinderserum
Ablesung nach 20 Std. 37° C Brutschrank

Antigen	Normalrinderserum, Verdünnung:										Kontrolle phys. NaCl + Antig.
	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2560}$		
P 2	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	
B 6	+++	+++	++	+	+	+	-	-	-	-	
Str. 37	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	
F 36	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-	
NH 4	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	
Bonn 146	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	

wendet. Auf 1000 ccm Nähragar genügte ein Eiweiß. Beide Substanzen wurden miteinander gemischt, im Dampftopf 45 Minuten gekocht und anschließend durch Watte filtriert. Nun wurden 5 Lösungen hergestellt:

- 1.) in 100 ccm destilliertem kaltem Wasser 2,0 g Eisensulfat;
- 2.) in 100 ccm destilliertem kaltem Wasser 0,8 g Natriumthiosulfat;
- 3.) in 100 ccm destilliertem kaltem Wasser 4,0 g Natriumsulfit;
- 4.) in 10 ccm warmem 96% Alkohol wurden 0,1 g Phenolrot gegeben und bis 100,0 ccm mit destilliertem warmem Wasser aufgefüllt (Indikatorlösung);
- 5.) In 1 Liter verflüssigter Grundsubstanz wurden 10 ccm der ersten drei Lösungen und 24,0 ccm der vierten Lösung gegeben.
Nun wurde der fertige Testnährboden zu 3-5 ccm in Reagenzgläser abgefüllt und im Dampftopf sterilisiert.

Die Vibrionenkulturen wurden in den Testnährboden überimpft und bei 37° C 72 Stunden lang bebrütet. Schon nach 24 Std. zeigte sich bei H_2S -Bildung eine Schwarzfärbung des Eisenagars, bei negativer Reaktion behielt der Nährboden seine rote Farbe.

Nach 72 Stunden wurden alle Röhrchen auf Vibrionenwachstum untersucht und die Beurteilung der Proben vorgenommen.

Bei der biochemischen Prüfung der 33 Vibrionenstämmen (Tabelle 13) erwiesen sich die Stämme der Gruppe I als katalasepositiv und H_2S -negativ, die Vibrionenstämmen der Gruppe II als katalasenegativ und H_2S -positiv.

Innerhalb der Gruppe III waren die aus Kot und Jauche isolierten Vibrionenstämmen katalasepositiv und H_2S -negativ. Ein aus einer Probe von einer Besamungsstation isolierter Stamm war katalasepositiv, ein weiterer katalasenegativ. Ebenfalls katalasenegativ und H_2S -positiv war ein Vibrionenstamm, welcher aus dem Scheidenschleim eines Rindes stammte.

Die serologische und biochemische Differenzierung ergab, daß die Gruppe I, die aus Foeten isolierten Vibrionen, zu den pathogenen Vibrionen, also zur Art *Vibrio foetus* zu rechnen ist. Der Gruppe II, welche vor allem die aus

T a b e l l e 13

Biochemische Differenzierung der Vibrionenstämme:

Stamm	Katalase- probe	H ₂ S- probe	Stamm	Katalase- probe	H ₂ S- probe
P ₂	+	-	27	+	-
Str. 37	+	-	61	-	+
B 6	+	-	62	-	+
NH 4	+	-	65	-	+
F 36	+	-	68	-	+
Bonn 146	+	-	69	-	+
800 V	-	+	70	-	+
9801	-	+	71	+	-
63	-	+	76	+	-
128	-	+	79	-	+
N 5	+	-	80	-	+
17	+	-	83	-	+
19	+	-	89	+	-
20	+	-	103	+	-
21	+	-	V 30	+	-
24	+	-	V 41	+	-
26	+	-			

dem Praeputium von Bullen stammenden Kulturen umfaßt, gehören die apathogenen Vibrionen im Genitaltrakt der Rinder an.

Es ist zu vermuten, daß die serologisch negativ reagierende Gruppe III gemäß ihrer Herkunft und Serologie nicht zu den pathogenen Vibrionen zu rechnen ist.

D. Besprechung der Ergebnisse

Mit den vorliegenden Untersuchungen wurde versucht, Vibrionenkulturen, welche aus dem verschiedensten Untersuchungsmaterial isoliert worden waren, auf ihr serologisches Verhalten zu prüfen. Dabei konnte mit der Serumagglutination - ähnlich den Versuchen von Bryner und Frank (8), Hubrig und Wothanka (26), Mitscherlich und Forschner (43) - ein serologisch erfaßbarer Typ, der zur Art *Vibrio foetus* zu rechnen ist, von einem anderen Typ (*Vibrio bubulus*) unterschieden werden.

Beide Gruppen hatten keine serologischen Beziehungen zueinander.

Vibrionenstämmen einer dritten Gruppe wiesen keine serologischen Reaktionen untereinander und auch nicht zu den anderen beiden Gruppen auf. Die Vibrionen dieser 3. Gruppe sind nach ihrem serologischen Verhalten und ihrer Herkunft zu urteilen, vermutlich saprophytärer Art.

Mit der Serumlangsamagglutination wurden die Endtiterwerte ermittelt. Die Agglutinationswerte wurden parallel, einmal nach 20 Stunden Brutschrankaufenthalt bei 37° C und zum anderen nach 2 Stunden Wasserbad bei 50° C abgelesen.

Als weiterer Faktor wurde die Elektrolytkonzentration verändert. Dabei ergaben sich nach dem Wasserbadaufenthalt bei 50° C mit 0,9 %iger Kochsalzlösung empfindliche Reaktionen, aber deutlich ablesbare Werte, welche für Vergleichsmöglichkeiten gut geeignet waren. Deshalb wurde dieser Methode der Ablesung der Vorzug gegeben.

Die Agglutinationsversuche zeigten, daß nicht zwischen allen *Vibrio-foetus*-Stämmen Kreuzreaktionen stattfanden, ebenso nicht zwischen allen *Vibrio-bubulus*-Stämmen. Dies beweist, daß innerhalb der einzelnen Vibrionenarten antigenische Unterschiede bestehen. Hohe Titerwerte in der Kreuzagglutination ließen auf serologisch einander nahestehende Vibrionenstämmen schließen. Niedrige Titerwerte könnten unspezifischen Geißelantigenen zugeschrieben werden; es kann sich um Stämme mit wenig gemeinsamen somatischen Antigenfraktionen handeln.

Um gemeinsame Antigenkomponenten zu erkennen, wurden Serumabsättigungen und Agglutinationen mit hitzebehandelten Antigenen durchgeführt. Mit den Absättigungsversuchen konnten nur gemeinsame Antigenkomponenten gefunden werden; es war mit der begrenzten Anzahl der Versuche nicht möglich, festzu-

stellen, ob ein Vibrionenstamm in der Zusammensetzung seiner Antigenanteile vollständig mit anderen Stämmen identisch ist. Dazu wären zusätzliche Kreuzabsorptionen nötig gewesen. Die Absättigungsversuche zeigten, daß innerhalb der *Vibrio-foetus*-Gruppe einige Stämme mit gemeinsamen Antigenfraktionen vorhanden sind, z.B. 17, 19, 20, 21 und Strain 37. Auf ähnliche antigene Eigenschaften dieser Stämme ließen schon die Titerwerte der Serumlangsamagglutination schließen. Meist ließen die Absorptionsversuche mit *Vibrio-foetus*-Stämmen aber nur wenig übereinstimmende Antigenfraktionen erkennen. Oft konnten einige Agglutinine, aber nicht alle, abgesättigt werden. Es waren die Seren, welche vor der Absättigung mit +++ oder ++, und nach der Absättigung mit dem gleichen Antigen eine Reaktion von nur + zeigten. Die Antigenkomponenten der untersuchten *Vibrio-foetus*-Stämme sind deshalb sicher vielfältiger Art und die meisten dieser Stämme weichen in der Zusammensetzung ihrer Antigenfraktionen voneinander ab.

Die Absorptionsversuche, welche an den *Vibrio-bubulus*-Stämmen durchgeführt worden waren, deuteten auf zwei Gruppen hin, innerhalb dieser beiden Gruppen traten gemeinsame Antigenfraktionen auf. Die Agglutinationsversuche mit hitzebehandelten Antigenen bestätigten diese Ergebnisse.

Die Titerwerte bei der Langsamagglutination mit erhitzten Antigenen lagen wesentlich niedriger als die Werte, welche mit nicht erhitzten Antigenen erhalten wurden. Nach den Angaben in der Literatur müssen wir den thermolabilen Faktor dem H-Antigen der Vibrionengeißel und den thermostabilen Faktor dem somatischen Antigen zuschreiben.

Es muß also angenommen werden, daß durch das Erhitzen des Antigens die H-Fraktion zerstört wurde. Die Kreuzagglutinationen zwischen den *Vibrio-foetus*-Stämmen sind daher im wesentlichen den hitzestabilen Antigenfraktionen zuzuschreiben. Denn nur in ganz wenigen Fällen trat bei den Agglutinationsversuchen mit hitzebehandelten Antigenen keine Kreuzreaktion mehr auf.

Die Schnellagglutinationstests, welche mit erhitzten Antigenen von *Vibrio-bubulus* ausgeführt wurden, zeigten zwei Gruppen voneinander getrennter, hitzestabiler Antigentypen. Sechs *Vibrio-bubulus*-Stämme können so von fünf weiteren *Vibrio-bubulus*-Stämmen serologisch getrennt werden. Die Kreuzagglutinationen zwischen beiden Gruppen, welche mit nicht erhitzten Antigenen auftraten, müssen somit einem thermolabilen Antigenfaktor zugeschrieben werden.

Der thermolabile Antigenanteil bei den Kreuzagglutinationen mit *Vibrio-foetus*-Antigenen war somit gering. Bei den Kreuzreaktionen mit *Vibrio-bubulus*-Stämmen war dieser Anteil stärker.

Bei der Prüfung einiger *Vibrio-foetus*-Stämme mit Normalrinderserum wurde eine unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Stämme hinsichtlich der Normalagglutinine des Rindes festgestellt. Drei Stämme wurden bei niedrigem Titer und drei mit hohem Titer (bis 1 : 640) agglutiniert. In der Literatur liegen Berichte über Stämme vor, welche Normalrinderserum mit hohem Titer agglutinierten. Nach Vandeplasse (65) sind *Vibrio-foetus*-Stämme, welche mit unspezifischen Agglutininen hohe Titerwerte (bis 1 : 800) geben, als Antigen zur Diagnose der *Vibrio-foetus*-Infektion mittels Mucoagglutination gut geeignet.

Zum Schluß wurde die biochemische Differenzierung der Stämme durchgeführt. Sie ergab, daß die auf Grund ihrer Herkunft und ihres serologischen Verhaltens als *Vibrio-foetus* bezeichneten Stämme katalasepositiv und H_2S -negativ waren. Die zur Art *Vibrio-bubulus* gehörenden Stämme waren katalasenegativ und H_2S -positiv.

Diese biochemische Untersuchung auf der Grundlage der Katalaseprüfung allein (katalasepositive Vibrionen = *Vibrio foetus*) reicht nicht aus, um die Identität von *Vibrio foetus* zu sichern. Sieben der zu diesen Versuchen verwendeten Stämme, wovon einer aus einer Besamungsstation stammte, waren katalasepositiv, wiesen aber keine serologischen Beziehungen zu anderen Vibrionensstämmen auf und sind wohl nicht zur Art *Vibrio foetus* zu rechnen. Deshalb müssen biochemische und serologische Eigenschaften zur Erkennung der *Vibrio*-nenart herangezogen werden.

E. Zusammenfassung

1. Es wurden 33 Vibrionenstämmen verschiedener Herkunft in ihrem serologischen Verhalten und auf Katalase-, sowie H_2S -Bildung geprüft.
2. *Vibrio-foetus*-Stämme wurden nur durch Antiseren agglutiniert, die nach Immunisierung von Kaninchen mit *Vibrio-foetus*-Stämmen gewonnen wurden. Sie bildeten Katalase, aber keinen Schwefelwasserstoff.
3. *Vibrio-bubulus*-Stämme wurden nur von Antiseren agglutiniert, welche nach Vorbehandlung von Kaninchen mit *Vibrio-bubulus*-Stämmen gewonnen wurden. Sie bildeten keine Katalase, aber H_2S .
4. Neun weitere Stämme, aus Jauche, Kot, Scheidenschleim vom Rind oder von Proben aus Besamungsstationen stammend, reagierten serologisch nicht mit heterologen Seren. Einige dieser Stämme bildeten Katalase, andere Schwefelwasserstoff.
5. Die Agglutinationsergebnisse nach 20 Stunden Brutschrank bei $37^{\circ}C$ und nach 2 Stunden Wasserbad bei $50^{\circ}C$ sowie mit 0,9 %iger und 5,0 %iger Kochsalzlösung als Elektrolyt wurden verglichen, wobei der Ablesung der Ergebnisse nach 2 Stunden Wasserbad mit 0,9 %iger $NaCl$ -Lösung der Vorzug gegeben wurde.
6. Durch Serumabsättigung wurden gemeinsame Antigenkomponenten innerhalb der Arten *Vibrio foetus* und *Vibrio bubulus* gefunden.
7. Agglutinationen mit hitzebehandelten Antigenen ließen hitzestabile und hitzelabile Antigenfraktionen erkennen.
8. Die meisten der untersuchten *Vibrio-foetus*-Stämme enthielten voneinander verschiedene Antigentypen. Bei Kreuzagglutinationen zwischen diesen Stämmen waren die thermolabilen Antigenanteile wenig beteiligt.

Die untersuchten *Vibrio-bubulus*-Stämme konnten in zwei Gruppen mit gleichartigen thermostabilen Antigenfraktionen eingeteilt werden. Kreuzreaktionen zwischen diesen beiden *Vibrio-bubulus*-Gruppen wurden dem thermolabilen Antigen der Vibrionengeißel zugeschrieben.
9. Die Katalase- und H_2S -Proben zeigten, daß die biochemische Differenzierung der Vibrionenstämmen zur Identifizierung der Art nicht ausreicht, sondern es sollten auch die serologischen Beziehungen geprüft werden.

F. Literaturverzeichnis

1. v. Ballmoos, P.: Über die Vibrionendysenterie des Schweines
Schweizer Arch. f. Tierheilkunde (1950)
154 - 175
2. Beer, J.: Vibrio-foetus-Funde in Sachsen-Anhalt
Berliner Münch. Tierärztl. Wschr. 1955 : 10
3. Bell, Wilson, B.: Vibrio-foetus Infektion in Virginia
Journ. Am. Vet. Assoc. 116 (1950) 36 - 37
4. Berthelou, M., Tournut, J.: La Vibriosis
Rev. d. Med. vet. 105 (1954) : 769
106 (1955) : 101
5. Binns, W., Fincher, M.G.: Vibriosis in cattle
Cornell Vet. 44 (1954) 512
6. Blakemoore, F., Gledhill, A.W.: Studies on vibrionic abortion of sheep -
I. The agglutination test as a means of
diagnosis 69 - 74
J. comp. Path. and Therap. 56 (1946)
7. Blakemore, F., Gledhill, A.W.: Studies on Vibrionic infection of sheep
II. The antigenic relationship between
strains of Vibrio fetus
J. comp. Path. 56 (1946) 74 - 77
8. Bryner, J.H., Frank, A.H.: A preliminary report on the identification
of Vibrio fetus
Am. J. Vet. Res. 16 (1955) 76
9. Dappes, Chs., Debrot, S.: (Schweiz) Contribution à l'étude de la
dysentérie à vibrions du porc
Schweiz. Arch. f. Tierheilkde. 95
(1953) 279
10. Dedié, K., Voigt, A.: Ein Vorkommen von Vibrio fetus beim Bullen
und seine mögliche Bedeutung
Mhefte f. Vet. Med. 9 (1954) 101
11. Dedié, K., Voigt, A.: Die Vibriosis genitalis in Mitteldeutschland
Mhefte f. Vet. Med. (1955) 462 - 469

12. Doyle, L.P.: The etiology of swine dysentery
Amer. J. Vet. Res. (1948) 50
13. Easterbrooks, M.L.,
Plastridge, W.N., Kiggins: Diagnostic and therapeutic considerations
Vet. Med. Vol. L Nr. 2 S. 51 (1955)
14. Ehrlich, J.: Beitrag zur klinischen Diagnose und Therapie
der Vibrio fetus Infektion beim Rinde
Tierärztl. Umschau 1955: 421 - 427
15. Mc. Fadyan u. Stockmann: Rept. Dept. Comm. Ministry Agric. an
Epizootic Abortion
London 1909, 156
16. Flatla, J.L., Braend, M.,
Sudboe, A.: Vibrio fetus beim Rind in Norwegen
Vet. Bull. 24 (1954) 421
17. Florent, A.: Isolment d'un vibriion saprophyte du sperme
du taureau et du vagin de la vache
C.r. Soc. Biol. 147 (1953) 2066
18. Florent, A.: Trichimonas foetus perd-il in vitro l'auti-
gène qu'il a eu commun avec vibrio foetus
C. r. Soc. Biol. 148 (1954) 1301
19. Galassi, D.: Seroagglutination bei Vibrio fetus
Arch. vet. ital. 6 (1955) 265
20. Gallut, J.: Recherches immunochimiques sur vibrio foetus
I Etude sérologique préliminaire de
10 souches d'origines diverses
Ann. de l'Inst. Pasteur 83 (1952) 444 - 454
21. Gallut, J.: Recherches immunochimiques sur vibrio foetus
II. Fractionnement chimique des corps micro-
biens et étude sérologique de deux fractions
antigéniques
Ann. de l'Inst. Pasteur 83 (1952) 455
22. Garm, O., Lindquist, K.,
Skjerven, O.: Podningsforsk på sau med. bovine Vibrio
fetus stammer
Nord. Vet.-Med. 7 (1955) 448-452
23. Goerttler, V.: Probleme der Vibriosis-Infektion und der
Vibriosisforschung
Mhefte Vet. med. 99 (1956)

24. Harms, Fr., Hörter, R.: Die Züchtung von *Vibrio fetus* und *Vibrio suis*
Dtsch. tierärztl. Wschr. 1953 320 - 322
25. Hoff, H., Kaldahl, M.: *Vibrio foetus*-Abort beim Schaf
Nord. Vet. med. 6 (1954) 1
26. Hubrig, Th., Wohanka, K.: Serologische und biochemische Untersuchungen an Vibrionen
Berl. u. München. Tierärztl. Wschr. 69 (1956) 4
27. Hubrig, Th., Wohanka, K., Gränz, G.: Zur Frage der *Vibrio*-fetus infizierten Deck- und Besamungsbullen
BMTW 24 (1956) 479 - 483
28. Hubrig, Th., Röhr, E.: Das charakteristische Wachstum von *Vibrio fetus* auf Blutagar
Zblt. Bakt. I. Origin 167 (1957) 233 - 237
29. Jones, F.S., Orcutt, M., Little, M.B.: Vibriosis associated with intestinal discharges of cows and calves
J. exp. med. 53 (1931) 853
30. Juhler, H.: Comparative serological examinations of 21 bovine strains of *Vibrio fetus*
Nord. Vet.-Med. 7 (1955) 52 - 62
31. Knuth, P., David, W.: Beobachtungen und Untersuchungen über Spirillen als Ursache ansteckenden Verwerfens beim Rind
Zeitschr. f. Infektionskr. 33 (1928) 19-33
32. Kutscher: *Spirillum undula minus* und *Spirillum undula majus*
Zbl. Bakt. I. Origin. 18 (1895) 614 - 616
33. Lagerlöf, N.: Untersuchungen über die *Vibrio foetus* Infektion als Ursache temporärer Unfruchtbarkeit des Rindes in Schweden
Fortpflanzung, Zuchtthygiene und Haustierbesamung in Dtsch.
Tierärztl. Wschr. 5 (1955) 7

34. Lerche: Spirillen als Ursache ansteckenden Verkalbens
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 1922 S. 281
35. Levi, M.L.: The Agglutinationstest in Vibrionic Abortion
of Sheep
J. comp. Path. 1950, S. 65 - 70
36. Lindenstruth, R.W.: Studies on vibronic abortion of sheeps.
J. Americ. Vet. med. Assoc. 1949, S. 204
37. Lindquist, K.: The accurence of vibrio strains other than
vibrio fetus in the genital organs of cattle
Nord. Vet. Med. 7 (1955) 826 - 832
38. Marsh, M.,
Firehammer, B.-B.: Serological relationships of twentythree
ovine and three bovine strains of Vibrio fetus
Amer. J. Vet. Res. 14 (1953) 396 - 398
39. Marsh, H.,
Tunnickliff, E.A.: The diagnostic significanse of the agglutina-
tion reaction for Vibriosis in sheep
J. Amer. Vet. Med. Assoc. 126 (1955) 100 - 103
40. Messerli, W.: Bakteriologische und serologische Untersuchun-
gen über den Vibrio coli des Schweines.
Vet. Diss. Bern 1953
41. Meyn, A.: Vorlesung beim Tierärztetag 1956 in München
42. Migula: System der Bakterien Bd. 2 - 1900
43. Mitscherlich, E.,
Forchner, E.: Untersuchungen über die Vibrio fetus Infektion
des Rindes
Mhefte. Tierheilkunde 8 (1956) 135 - 147
44. Moore, G., R.: Clinical aspects of Vibrio foetus Infection
in Cattle
Journ. Am. Vet. Assoc. 116 (1950) 190 - 192
45. Mundt, W.: Vibrio fetus Sammelreferat
BMTW 69 (1956) 190
46. Nowak: Die Züchtung von Vibrio foetus
Medyc. Wet. Warszawa 11 (1955) 12
ref. Vet. med. 8 (1955) 358

47. Plastridge, W.N., Williams, L.F., Easterbrooks, H.L., Walker, E.C., Beccia, R.N.: *Vibriosis in Cattle*
Bull. 281, Stor. Agric., Exper Sta. 1951
48. Plastridge, W.N. et al: *Vibrio Fetus in Cattle*
Vet. Bull. 23 (1953) 397
49. Price, K.E., Poelma, L.J., Faber, J.E.: *Preliminary report on serological relationships between strains of Vibrio Fetus*
Vet. Med. 48 (1953) 355 - 358
50. Price, K.E., Poelma, L.J., Faber, J.E.: *Serological and physiological relationships between strains of Vibrio fetus*
Amer. J. Vet. Res. 16 (1955) 164
51. Prier, J.E.: *Vibrio abortus*
Vet. med. Kansas 47 (1952) 85
52. Präger, K.: *Erfahrungen bei der Bekämpfung der Fruchtbarkeitsstörungen*
Mhefte f. Vet. Med. 194 (1955)
53. Ristic, M., Sanders, O., A., Tyler, M.E.: *Vibrio fetus Infection in Cattle*
I. A comparative study of the agglutinin resp. in cervico vaginal mucus and blood serum to homologous antigens following abortion
Amer. J. Vet. Res. 16 (1955) 246
54. Ristic, M., Sanders, O.A., Young, F.: *Experimental Vibrio fetus infection in male hamsters*
Amer. J. Vet. Res. 16 (1955) 189-192
55. Rolle, M., Mundt, W.: *Untersuchungen über Vibrio fetus und ähnliche Mikroorganismen*
Zbl. Vet. Med. 1 (1954) 759 - 772
56. Ryff, J.F.: *Vibrionic abortion in Michigan Sheep*
J. Amer. Vet. Med. Assoc. 97 (1940), 452 - 453

57. Schmidt, G., Klingler, K.: Über einige Schweinekrankheiten, von einem neuen ätiologischen Faktorenkomplex aus betrachtet
DTW 53 (1951) (285 - 289)
58. Sjollema, P.: *Vibrio foetus* infection in Cattle and its influence on fertility
Report of the II Int. Congr. Physiol. and Pathol., Bd. III 35 Kopenhagen 1952
59. Smith, Th., Taylor, M.S.: Some Morphological and Biological Characters of the Spirilla (*Vibrio fetus* n. sp.) associated with Disease of the fetal Membranes of Cattle
J. Exptl. Med., 30 (1919) 299 - 312
60. Smith, Th., Orcutt, M.L.: Zit. nach Wiidik u. Hlidar
Zblatt f. Vet. Med. 1955
61. Stengenga, Th.: *Vibrio foetus* en enzootische Sterilität
Vet. med. Diss. Utrecht 1950
62. Terpstra, J.L., Eisma, W.A.: *Vibrio fetus* infection in Cattle and enzootic infertility
Tschr. Diergeneesk., 1951, S. 433
63. Terpstra, J.L.: *Vibrio foetus* in Holland
Vet. Bull. 25 (1955) 104
64. Thouvenot, H., Florent, A.: Etudes d'un anaerobic du sperme du taureau et du vagin de la vache: *Vibrio bubulus*.
Ann. Inst. Pasteur 86 (1953) 237 - 241
65. Vandeplasseche, M.,
Paredis, F.,
van Niewenhuyse, E.,
Brone, E., Florent, A.: Beiträge zur *Vibrio-foetus*-Infektion bei Rindern mit besonderer Berücksichtigung der Unfruchtbarkeit
Zblt. Vet. med. 3 (1956) 111
66. Voigt, A.: Die Bakteriologie der Deckinfektionen des Rindes mit besonderer Berücksichtigung der *Vibriosis genitalis*.
Mhefte f. Vet. Med. 1955, S. 210 - 215
67. Voigt, A., Dedié, K.: Mhefte f. Vet. Med. 1955 (463 - 469)

68. Voigt, A.: Zur Vibriosis genitalis des Rindes
Arch. exp. Vet. Med. 9 (1955) 1240
69. Welsh, H., Marsh, H.: Vibrionic abortion in sheep
J. Amer. Vet. Med. Assoc. 65 (1924)
203 - 210
70. Wiidik, R.W., Hlidar, G.F.: Untersuchungen über die antigene Struktur
von *Vibrio fetus* vom Rind. Das Kapselantigen.
Zblatt f. Vet. Med. 1955, S. 238
71. Wohanka, K.: Kritische Bemerkungen zur Frage der Vibriosis
genitalis in Rinderbesamungsringen Mittel-
deutschlands.
Mhefte f. Vet. Med. 1956
72. Wohanka, K., Hubrig, Th.: Enzootische Sterilität und Vibriose.
Berliner u. Münchener Tierärztl. Wschr. 69
(1956) 105
73. Zintz, G.: Über das Vorkommen der Vibrionen und Spiril-
len im Verdauungstraktus bei Tieren.
Vet. Diss. München 1955

Am Schlusse der Arbeit möchte ich

Herrn Professor Dr. A. M e y n

für die Überlassung des Themas und seine
Unterstützung, sowie

Herrn Privat-Dozent Dr. K a l i c h
und

Herrn Dr. B u r g e r

für die Anleitung und Beratung während der
Arbeit herzlich danken.

Lebenslauf

Am 5. Januar 1930 wurde ich, Wilhelm Werner S c h a r f, als Sohn des Landwirts Kurt Scharf und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Barth, in Leubnitz, Krs. Zwickau, geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Leubnitz und der Alexander-v-Humboldt-Oberschule in Werdau legte ich 1949 die Reifeprüfung ab.

1952 begann ich das Studium der Tierheilkunde in Leipzig, setzte es 1953 bis 1955 an der veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität B e r - l i n fort und beendete es 1956 in München mit der tierärztlichen Prüfung.

Seit Oktober 1957 bin ich bei Herrn Dr. Weis als Veterinärpraktikant in Sinzheim, Kreis Bühl/Baden tätig.

